昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，March 2007，50(3)：222－233　ISSN 0454-6296

家蚕幼虫中肠细菌群落多样性的 PCR-DGGE 和 16S rDNA 文库序列分析

相辉[1]，**李木旺**[1,3]，**赵勇**[2]，**赵立平**[2]，**张月华**[3]，**黄勇平**[1,*]

（1. 中国科学院上海生命科学院植物生理生态研究所，上海　200032；
2. 上海交通大学生命科学与技术学院生物技术系，上海　200240；
3. 中国农业科学院蚕业研究所，江苏镇江　212018）

摘要：采用基于 16S rDNA 的变性梯度凝胶电泳（denaturing gradient gel electrophoresis，DGGE）和 16S rDNA 文库序列分析的手段，研究了重要经济昆虫家蚕 *Bombyx mori* 2 个品系——专食性品系 C108 和广食性品系 SCN2 幼虫中肠内的细菌群落多样性，同时还探讨了食料对家蚕中肠内细菌群落结构的影响。文库序列分析表明，PCR 扩增得到的 16S rDNA 基因代表了家蚕中肠内的 41 种细菌系统发育型（phylotype），大多数属于 Proteobacteria，其次是 Lactobacillales。此外，还有少数属于 Deinococcus-Thermus、Bacillales、Clostridiales 和 Actinobacteria，尚有 5 种系统发育型不能确定其所属类型。家蚕的这 2 个品系中，肠球菌属 *Enterococcus* 是其中肠细菌的优势菌群，栖热菌属 *Thermus* 是次优势菌群。优势菌肠球菌属的组成在品系和不同食料喂养条件下有着一定的变化，无桑饲料喂养条件下 SCN2 品系中肠内还出现了新的次优势菌葡萄球菌（*Staphylococcus*）。DGGE 图谱显示家蚕低龄幼虫和高龄幼虫肠道细菌格局存在差异，推测可能与其发育期生理状态的差异有关。本研究结果提示家蚕肠道特殊菌群的出现可能与其特殊的食性有一定的关系，食料改变、生长受阻后肠道微生态平衡也发生变化。

关键词：家蚕；专食性；广食性；中肠细菌；变性梯度凝胶电泳；16S rDNA 文库分析

中图分类号：Q968.1　**文献标识码：**A　**文章编号：**0454-6296(2007)03-0222-12

Bacterial community in midguts of the silkworm larvae estimated by PCR/DGGE and 16S rDNA gene library analysis

XIANG Hui[1]，LI Mu-Wang[1,3]，ZHAO Yong[2]，ZHAO Li-Ping[2]，ZHANG Yue-Hua[3]，HUANG Yong-Ping[1,*]
(1. Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology，Shanghai Institutes for Biological Sciences，Chinese Academy of Sciences，Shanghai 200032，China；2. Department of Biotechnology，Shanghai Jiao Tong University，Shanghai 200240，China；3. Sericultural Research Institute，Chinese Academy of Agricultural Sciences，Zhenjiang，Jiangsu 212018，China)

Abstract：We inventoried the bacteria community and the effects of diet on bacterial composition in larval midguts of two strains (the monophagous C108 and the polyphagous SCN2) of the silkworm，*Bombyx mori* L.，an economically important insect，using 16S PCR-DGGE and clone libraries. DNA sequence analysis indicated that the PCR-amplified 16S rDNA genes represented 41 phylotypes of bacteria. Most of them belonged to the Proteobacteria and Lactobacillales，whereas less dominant taxa including members of the Deinococcus-Thermus，Bacillales，Clostridiales and Actinobacteria were also found in the midgut bacterial community. Phylotypes of *Enterococcus* were the most dominant group in both strains tested，followed by *Thermus*. Bacterial composition or population structure of *Enterococcus* varied between the two strains and in the same strain fed with different diets. Especially，when strain SCN2 was fed with mulberry-free artificial diet，a midgut phylotype belonging to *Staphylococcus* appeared with a fairly high proportion. DGGE profiles demonstrated that there were differences in the bacterial pattern between young and old larvae. This might be

---

基金项目：国家重点基础研究发展规划'973'项目（2005CB121000）

作者简介：相辉，女，1978 年 7 月生，陕西人，博士研究生，从事昆虫发育及肠道微生物研究，E-mail：xhui@sippe.ac.cn

* **通讯作者** Author for correspondence，E-mail：yongping@sippe.ac.cn

收稿日期 Received：2006-05-12；**接受日期** Accepted：2006-08-30

related with the differences of physiology between the two developmental stages. The results suggested that the appearance of special bacteria might associate with the special phagy of the silkworm, and unfit diet might destroy the balance of midgut microbiota to block normal growth of the silkworm.

Key words: *Bombyx mori*; monophagous; polyphagous; midgut bacteria; DGGE; 16S rDNA libraries

昆虫肠道中栖居着大量的微生物，构成了肠道的微生态体系。微生物对昆虫的生长和发育起着重要作用，如可能参与昆虫的消化、营养吸收、繁殖（Campbell，1989），甚至信息素的合成（Brand *et al*.，1975；Dillon *et al*.，2002），同时还间接抵抗病原微生物的侵袭（Dillon *et al*.，2005）。相对于哺乳动物，昆虫与其肠道微生物共生关系的研究刚刚起步，较为深入的探索仅仅集中在一些特殊的类群如白蚁、蚜虫（Brune and Friedrich，2000；Brauman *et al*.，2001；Douglas *et al*.，2002；Haynes *et al*.，2003）和重要农业害虫蝗虫（Dillon and Charnley，2002），而对其他种类昆虫的肠道微生物的研究则很少。鳞翅目是昆虫纲的一个重要类群，已有的研究表明鳞翅目昆虫的肠道内栖息着相当数量的微生物类群（McKillip *et al*.，1997；Broderick *et al*.，2004），这些微生物对于该类昆虫的营养和代谢同样起着重要的作用。

Takizawa 和 Iizuka（1968）在早期有过一些针对鳞翅目家蚕的肠道微生物的研究报道。国内研究者曾采用传统的培养手段初步调查了家蚕肠道微生物种类（马文石，1982；李蒙英等，2000）。已经发现的家蚕肠道主要菌群有肠球菌 *Enterococcus* spp.、葡萄球菌 *Staphylococcus* spp.、阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae* 和腊样芽孢杆菌 *Bacillus cereus*（Takizawa and Iizuka，1968；李蒙英等，2000）。张剑飞等（2002）的研究发现了丰富的细菌种类和动态变化，其中微球菌 *Micrococcus* spp. 和芽孢杆菌 *Bacillus* spp. 占优势。从这些研究中可以看出，虽然人们对家蚕肠道细菌有一定的认识，但可能是由于蚕种质资源及其肠道细菌的多样性或者研究手段的差异，目前尚没有较为一致的意见。

由于细菌自身的特点，使得研究昆虫与其肠道细菌相互关系变得复杂。因为很多种细菌无法培养，传统的依靠培养手段应用于细菌菌落结构研究往往有很大的局限性（Vaughan *et al*.，2000）。基于原核生物的 16S rDNA 的分子生物学技术的应用，如利用核糖体 16S rDNA 作为分子标记的变性梯度电泳（denaturing gradient gel electrophoresis，DGGE）（Muyzer *et al*.，1998）以及文库（clone libraries）序列分析（Ohkuma and Kudo，1996）为发现和区分无法培养的微生物提供了手段。16S rDNA 存在于所有原核生物细胞中，被广泛用于细菌的系统学研究（Schmidt and Relman，1994），是细菌种类鉴定的一个重要参考依据，已经应用在一些昆虫肠道微生物多样性的研究中（Reeson *et al*.，2003；Broderick *et al*.，2004）。

家蚕是我国重要的经济昆虫。由于对其营养利用和代谢环节中的机理研究相对缺乏，对养蚕业中的生产率低、叶丝转化率低、蚕病发生率高等问题还难以提出有效的解决方案，我国每年因蚕病损失的茧量达 10% 以上。研究家蚕肠道微生物体系来指导提高饲料利用率、培育广食性品种、增强抗病品种选育等，已成为蚕业生产的发展方向之一。

本研究采用核糖体 16S rDNA 作为分子标记的变性梯度电泳以及文库序列分析这两种分子生物学手段，对不同饲料喂养条件下家蚕两种食性范围差异较大品系的肠道细菌区系进行了研究，试图探讨肠道细菌与家蚕食性可能的联系以及食料对其肠道微生态结构可能的影响，进而为家蚕品种改良和疾病防治提供理论依据。

1　材料和方法

1.1　供试家蚕品系及饲养方法

供试家蚕为专食性品系 C108 和选育出的广食性品系 SCN2。蚕卵由中国农科院镇江蚕业研究所提供。专食性品系 C108 食性较为单一，主要食桑叶和含桑饲料，但食含桑饲料时生长较慢，食无桑饲料时蚁蚕死亡率达 100%；广食性品系 SCN2 食性相对较宽，主食桑叶和含桑饲料的同时也能忍受无桑饲料，食含桑饲料时生长减慢，食无桑饲料时死亡率较高，生长极为缓慢（表 1）。蚕卵在 25℃ 培养箱中孵育。经催青孵化后，蚁蚕按照如下方式喂养：C108 蚁蚕分为 2 组：桑叶组，以新鲜桑叶在紫外光下消毒 10 min 后喂养；含桑饲料组，用含有桑叶粉的无菌饲料喂养。SCN2 蚁蚕分为 3 组：桑叶组及含桑饲料组处理方法同前；无桑饲料组，以不含桑叶粉的饲料喂养。桑叶及饲料均由中国农科院镇江蚕业研究所提供。

表 1　家蚕 2 个品系幼虫在不同饲料喂养条件下的体重（$n = 10$，平均值 ± 标准差）

Table 1　Larval body weight of the two silkworm strains feeding on different diets（$n = 10$，mean ± SD）

家蚕品系 Strain	**食料类型** Type of diet	**体重** Body weight（kg）（$\times 10^{-3}$）	
		3 龄 3rd instar	5 龄 5th instar
C108	**桑叶** Mulberry leaves	0.05 ± 0.01	0.67 ± 0.08
	含桑饲料 Artificial diet（containing mulberry powder）	0.03 ± 0.01**	0.23 ± 0.05**
SCN2	**桑叶** Mulberry leaves	0.07 ± 0.01	1.07 ± 0.10
	含桑饲料 Artificial diet（containing mulberry powder）	0.05 ± 0.01**	0.68 ± 0.11**
	无桑饲料 Artificial diet（mulberry free）	0.01 ± 0.00**	0.15 ± 0.07**

注 Notes：**部分家蚕到 4 龄已出现严重的生长停滞，其中相当一部分家蚕在进入 5 龄之前死亡。** Some individuals stopped growing at the 4th instar and many of them died before getting into the 5th instar stage. **：$P < 0.01$.

1.2　中肠的分离及总 DNA 的提取

每个处理的幼蚕生长到 3 龄第 2 天时，各取 5 头，无菌操作条件下解剖出中肠，仔细取出并抛弃中肠内含物，在无菌水中缓慢清洗后放入一个灭菌的 2 mL 离心管中，－20℃条件下保存以便用于 DNA 的提取。长到 5 龄 2～3 天时，以同样的方法取样和保存。总 DNA 的提取参考 Lau 等（2002）的方法，溶于 200 μL 无菌去离子水中，以分光光度计（Eppendorf）测定浓度。

1.3　PCR 扩增

用引物 27f（5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′）（Edwards *et al*., 1989）和 1492r（5′-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3′）（Weisburg *et al*., 1991）扩增家蚕中肠的 16S rDNA 以构建文库。25 μL PCR 反应体系中包含：DNA 模板 5 μL，引物（10 μL/mL）各 0.5 μL，dNTPs（10 mmol/mL）0.5 μL，10 × Taq PCR reaction buffer（含 Mg^{2+}）2.5 μL 和 0.5 U 的 Ex Taq DNA 聚合酶（TaKaRa）。PCR 反应在 PCR 仪（TECHNE，Flexigene）上进行。扩增程序为：95℃预变性 1.5 min；95℃ 0.5 min，60℃ 0.5 min，72℃ 3 min，循环 5 次；95℃ 0.5 min，55℃ 0.5 min，72℃ 3 min，循环 5 次；95℃ 0.5 min，50℃ 0.5 min，72℃ 3 min，循环 25 次；72℃ 延伸 10 min。

DGGE 的 16S rDNA V3 区扩增所用的引物为：343f（5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3′）和 534r（5′-ATTACCGCGGCTGCTGG-3′）（Nakatsu *et al*., 2000）。在正向引物的 5′端加入一段称作‘GC 钳’的富含 GC 的序列（5′-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCCCGGGGG-3′）以提高 PCR 产物在进行变性梯度电泳时的稳定性。PCR 反应体系同前。扩增程序为（Nakatsu *et al*., 2000）：94℃预变性 5 min；第 1、2 循环 94℃变性 1 min，64℃退火 1 min，72℃ 延伸 2 min；其后的 18 个循环，退火温度每 2 个循环降低 1℃，其他条件不变；最后 15 个循环退火温度为 55℃，其他条件不变；72℃ 延伸 10 min。

PCR 产物经过一次扩增（95℃ 0.5 min，50℃ 0.5 min，72℃ 1 min，循环 3 次；72℃ 延伸 10 min）后，用 PCR 产物纯化试剂盒（申能博彩）纯化。

1.4　16S rDNA 文库的构建及序列分析

对 5 龄各个处理组的 16S rDNA PCR 产物构建文库。已纯化的 16S 全长 PCR 产物（1.5 kb 左右）连接到 pMD18-T 载体（TaKaRa）后转入大肠杆菌 *E. coli*。每个文库至少挑取 95 个阳性克隆，以 m13 通用引物扩增得到的产物（1.5 kb 左右，约 80 ng），用 *afa* Ⅰ和 *Hin*f Ⅰ（TaKaRa）两种限制性内切酶 37℃消化 4 h 左右，酶切产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测，得到所有克隆的限制性酶切图谱。根据该图谱分别对每一个文库中的所有克隆进行分型，每一种类型即是分类操作单位（operational taxonomic unit，OTU）（Moyer *et al*., 1996）。属于同一个 OTU 的克隆即使不是完全一样，也在系统分类学上非常接近（Moyer *et al*., 1996），所以我们选一个代表进行测序。5 个处理进行测序的样品数分别为：C108 桑叶组，27；C108 含桑饲料组，24；SCN2 桑叶组，31；SCN2 含桑饲料组，14；SCN2 无桑饲料组，31。某一种系统发育型的克隆数占该文库所有克隆数的比例作为该系统发育型的相对丰度。

用 Chromas V.2.23（Technelysium）软件对测序结果进行扫描和处理。对从 16S rDNA 第 27 碱基处开始，包含 V3 区的前 550 bp 的有效序列信息，在 NCBI

数据库（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST）中进行比对，寻找同源性最高的序列。同源性以一致序列所占的百分比（identity）作为标准。

用Sorenson's成对相似性系数（Cs）比较不同处理组间中肠细菌群落的相似性。我们以属水平进行比较，$Cs = 0$ 表示两种处理组肠道细菌菌落没有相同的属，$Cs = 100$ 表示两种处理组肠道细菌菌落拥有完全相同的属。

$$Cs = [2j/(a+b)] \times 100。$$

公式中，a 表示细菌群落 a 中所有的属数，b 表示细菌群落 b 中所有的属数，j 表示 a，b 群落中公有的属数。

1.5 变性梯度凝胶电泳（DGGE）及产物割胶回收

采用Bio-Rad D-code系统（Hercules CA），8%（W/V），以变性范围在25%～65%（100% = 7 mmol/L尿素和40%去离子甲酰胺［V/V］）的聚丙烯酰胺变性胶（丙烯酰胺∶甲叉双丙烯酰胺 = 37.5∶1，W/W）对16S rDNA V3区扩增片段（200 bp左右）进行DGGE分析。PCR产物经浓缩后加入2 μL 6×载样缓冲液（TaKaRa），在Bio-Rad D-code系统中，60℃，200 V电压下电泳4 h。电泳结束后用SYBR-I染色剂（BMA）染色30 min后在凝胶成像系统（天能）中成像。用消毒的手术刀割下目的条带，置于1.5 mL离心管中，加入30 μL无菌去离子水，用灭菌牙签仔细捣碎胶条，4℃放置过夜后，取5 μL作为模板，用前述343f和534r引物进行PCR反应（95℃ 0.5 min，50℃ 0.5 min，72℃ 1 min，循环10次；72℃延伸10 min）。用纯化试剂盒（申能博彩）纯化产物后连接到pMD18-T载体（TaKaRa），转化入大肠杆菌。克隆经m13通用引物检测后，每个条带随机挑选3个阳性克隆测序。

用Chromas V.2.23（Technelysium）软件对测序结果进行扫描和处理。对从16S rDNA第343 bp处开始，V3区的200 bp左右的有效序列信息，在NCBI数据库（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST）中进行比对，寻找同源性最高的序列。同源性以一致序列所占的百分比作为标准。

2 结果与分析

2.1 家蚕5龄幼虫中肠细菌的多样性

16S rDNA文库序列分析结果表明，家蚕C108和SCN2品系5龄幼虫中肠共发现41种细菌系统发育型（phylotype）（表2）（食桑叶组分离到的大量叶绿体16S rDNA不在统计范围内）。41种系统发育型中大多数属于Proteobacteria，其中属于Alpha Proteobacteria的有8种，Beta Proteobacteria 10种，Gamma Proteobacteria 3种。Lactobacillales也是一个优势类群，属于它的系统发育型有9种。此外，属于Deinococcus-Thermus、Bacillales、Clostridiales和Actinobacteria的系统发育型分别有2种、1种、1种和2种，另外还有5种不能确定其所属类型。家蚕的这2个品系中，肠球菌属 *Enterococcus* 是中肠细菌的优势菌群，所占比例最高可达82.72%（表3），最低也占50%（表4）（桑叶叶绿体16S rDNA不在统计范围内）。栖热菌属 *Thermus* 是次优势菌群，所占比例最高为15.60%（桑叶叶绿体16S rDNA不在统计范围内），最低为4.32%（表3）。

优势菌群肠球菌属 *Enterococcus* 中，种类多样性较为丰富，所比对到的序列一致性较高的种类有 *E. mundtii*，*E. casseliflavus*，*E. gallinarum* 和 *E. saccharolyticus*，并且这4种属于优势种；而 *E. dispar*，*E. canintestini* 和 *E.* sp.所占比例很低，分别为0.62%，3.09%和0.62%（表4）。

栖热菌属 *Thermus* 中，比对到的主要是 *Thermus scotoductus*（原始数据未显示），对这些系统发育型进行完整测序，序列一致性≥99%。测序结果已被美国GenBank数据库收录，登录号为DQ861411，在390和417 bp处出现单核苷酸多态，在197 bp处碱基为胞嘧啶C，而不是 *Thermus scotoductus* 的胸腺嘧啶T；在954 bp处碱基为腺嘌呤A，而不是 *Thermus scotoductus* 的鸟嘌呤G。

2.2 2个品系中肠道细菌的比较及食料对肠道细菌群落结构的影响

从表3中可以看出，属水平上2个品系的肠道优势菌组成相似。其中占据优势的都是肠球菌 *Enterococcus*，而次优势菌也都是栖热菌 *Thermus*（表3）。然而，肠球菌属在2个品系肠道中呈现出较为丰富的多样性，并且食料的差异对于肠球菌优势种类的组成有较为明显的影响（表4）。同食桑叶时，C108品系肠道优势菌为 *E. mundtii* 的系统发育型，而SCN2品系则是 *E. casseliflavus*；同食含桑饲料时，C108品系除了与SCN2品系都含有 *E. mundtii*，*E. casseliflavu* 这两种优势菌的系统发育型外，它还有 *E. gallinarum* 这种优势菌的系统发育型，其在SCN2品系肠道中没有出现，可认为是C108的特有优势菌。SCN2品系食无桑饲料时，*E. saccharolyticus* 的系统发育型成为其中肠优势菌，此

表2 家蚕幼虫中肠细菌16S rDNA序列与NCBI数据库的比对结果

Table 2 Nearest match identification of bacterial 16S rDNA sequences isolated from midguts of silkworm larvae in NCBI GenBank

类群 Group	基因库中同源性最高的序列 Most closely related hit in GenBank	序列号 Accession no.	C108				SCN2					
			桑叶 Mulberry leaves		含桑饲料 Artificial diet (containing mulberry powder)		桑叶 Mulberry leaves		含桑饲料 Artificial diet (containing mulberry powder)		无桑饲料 Artificial diet (mulberry free)	
			一致性 Identity (%)	克隆数 Clone number*	一致性 Identity (%)	克隆数 Clone number*	一致性 Identity (%)	克隆数 Clone number*	一致性 Identity (%)	克隆数 Clone number*	一致性 Identity (%)	克隆数 Clone number*
	Cucumis sativus chloroplast	67511377	99	9			99	7				
乳杆菌目 Lactobacillales	*Enterococcus mundtii*	AY439006.1	99	6	99	2			99	7		
	E. casseliflavus	AF039903.1			95	1	95	8	98	1	99	1
	E. gallinarum	AJ301833.1			98	1						
	E. saccharolyticus	U30931.1			98	1					99	6
	E. dispar	AF061007.1			99	1						
	E. canintestini	AJ888906.1									99	1
	Enterococcus sp.	AM084029.1									99	1
	Abiotrophia defectiva	D50541.1							98	1		
	Unidentified Hailaer soda lake bacterium	AF275700.1			98	1						
异常球菌-栖热菌门 Deinococcus-Thermus	*Thermus scotoductus*	Y18410.1	99	3			99	3	99	1	99	2
	Thermus sp.	AJ871174.1			92	1	99	1	99	1	99	2
α-变形菌纲 Alpha PB	*Rhizobium* sp.	AJ971481.1	99	1			97	1				
	Sphingomonas mali	Y09638.1	96	1								
	Sphingomonas sp.	AB023290.1	91	1	99	1	97	1				
	Uncultured alpha proteobacterium clone	AF509578.1			98	1						
	Uncultured alpha proteobacterium	AF288301					98	1				
	Methylobacterium sp.	AY358000.2					99	1				
	Uncultured alpha proteobacterium clone	AY728074.1			99	1						
	Ochrobactrum sp.	AY661464.1									100	1
β-变形菌纲 Beta PB	Uncultured beta proteobacterium clone	AY622246.1	97	1								
	Dehydroabietic acid-degrading bacterium	AF125877.1	98	2	99	1						
	Ralstonia sp.	AF525456.1	98	1			99	1			99	1
	Uncultured *Janthinobacterium* sp.	AY359827.1			97	1						
	Aquaspirillum autotrophicum	AB074524.1			98	1						
	Acidovorax sp.	AM084035.1					99	1				
	Uncultured *Aquabacterium* sp.	AF523055.1					97	1			99	1

续表 2 Table 2 continued

类群 Group	基因库中同源性最高的序列 Most closely related hit in GenBank	序列号 Accession no.	C108 桑叶 Mulberry leaves		C108 含桑饲料 Artificial diet (containing mulberry powder)		SCN2 桑叶 Mulberry leaves		SCN2 含桑饲料 Artificial diet (containing mulberry powder)		SCN2 无桑饲料 Artificial diet (mulberry free)	
			一致性 Identity (%)	克隆数 Clone number*	一致性 Identity (%)	克隆数 Clone number*	一致性 Identity (%)	克隆数 Clone number*	一致性 Identity (%)	克隆数 Clone number*	一致性 Identity (%)	克隆数 Clone number*
	Massilia sp.	DQ177478.1									98	1
	Uncultured beta proteobacterium clone	DQ110069.1									99	1
	Thermothrix thiopara	L77877.1									99	1
γ-变形菌纲 Gamma PB	*Acinetobacter calcoaceticus*	AY800383.1			99	1						
	A. haemolyticus	AY586400.2									99	1
	Frateuria sp.	AY495957.1							99	1		
芽孢杆菌目 Bacillales	*Staphylococcus* sp.	AB188210.1									98	4
梭菌目 Clostridiales	*Veillonella* sp.	AY995756.1			99	1						
放线菌门 Actinobacteria	*Arthrobacter viscosus*	AJ639832.1	96	1								
	Actinomyces sp.	AY008315.1							99	1		
未确定 Unidentified	Uncultured bacterium	AB062159.1			95	2						
未确定 Unidentified	Uncultured bacterium clone	AY571410.1			99	1						
未确定 Unidentified	Uncultured earthworm intestine bacterium clone	AY154495.1					97	1				
未确定 Unidentified	Uncultured bacterium	AB185006.1									93	1
未确定 Unidentified	Uncultured bacterium clone	AY917536.1									98	1

种系统发育型在C108品系中丰度极低（0.62%），可认为是SCN2的特有优势菌。并且在食无桑饲料时，SCN2品系肠道中还出现了一种丰度较高的系统发育型，以98%的序列一致性比对到葡萄球菌属的 *Staphylococcus* sp.，也为该品系特有的次优势菌。

表3 家蚕幼虫中肠细菌属的相对丰度（%）

Table 3 Relative abundance (%) of bacterial genera in midguts of the silkworm larvae

类群 Group	属 Genus	C108		SCN2		
		桑叶 Mulberry leaves	含桑饲料 Artificial diet (containing mulberry powder)	桑叶 Mulberry leaves	含桑饲料 Artificial diet (containing mulberry powder)	无桑饲料 Artificial diet (mulberry free)
Cucumis sativus chloroplast		66.67		27.37		
乳杆菌目 Lactobacillales	*Enterococcus*	16.16	82.72	54.74	79.81	59.26
	Abiotrophia				0.92	
	其他 Others		1.85			
异常球菌-栖热菌门 Deinococcus-Thermus	*Thermus*	7.07	4.32	6.32	15.60	11.11
α-变形菌纲 Alpha PB	*Rhizobium*	1.01		3.16		
	Sphingomonas	2.02	0.62	1.05		
	Methylobacterium			1.05		
	Ochrobactrum					1.85
	其他 Others		1.23	1.05		
β-变形菌纲 Beta PB	*Aquaspirillum*		0.62			0.62
	Ralstonia	3.03		1.05		4.32
	Acidovorax			1.05		
	Massilia					0.62
	Thermothrix					3.69
	Janthinobacterium		1.85			
	Aquabacterium			1.05		
	其他 Others	3.03	2.47			0.62
γ-变形菌纲 Gamma PB	*Acinetobacter*		1.85			0.62
	Frateuria				2.75	
芽孢杆菌目 Bacillales	*Staphylococcus*					11.73
梭菌目 Clostridiales	*Veillonella*		0.62			
放线菌门 Actinobacteria	*Arthrobacter*	1.01				
	Actinomyces				0.92	
未确定 Unidentified	未培养细菌 Uncultured bacterium		1.85	2.11		5.56

表4 家蚕幼虫中肠肠球菌属系统发育型的确定及其所占的比例

Table 4 Nearest match identification and relative abundance of *Enterococcus* phylotypes in midguts of the silkworm larvae

基因库中同源性最高的序列 Most closely related hit in GenBank	序列号 Accession no.	C108				SCN2					
		桑叶 Mulberry leaves		含桑饲料 Artificial diet (containing mulberry powder)		桑叶 Mulberry leaves		含桑饲料 Artificial diet (containing mulberry powder)		无桑饲料 Artificial diet (mulberry free)	
		一致性 Identity (%)	占中肠细菌比例 Proportion (%)	一致性 Identity (%)	占肠道细菌比例 Proportion (%)	一致性 Identity (%)	占肠道细菌比例 Proportion (%)	一致性 Identity (%)	占肠道细菌比例 Proportion (%)	一致性 Identity (%)	占肠道细菌比例 Proportion (%)
E. mundtii	AY439006.1	99	50	99	38.89			99	59.63		
E. casseliflavus	AF039903.1			95	21.60	95	75.36	98	20.18	99	0.62
E. gallinarum	AJ301833.1			98	20.99						
E. saccharolyticus	U30931.1			98	0.62					99	54.94
E. dispar	AF061007.1			99	0.62						
E. canintestini	AJ888906.1									99	3.09
E. sp.	AM084029.1									99	0.62

群落相似性比较结果显示（表 5），在属水平，2 个品系同食桑叶时肠道细菌群落相似度较高（58.82 ＞50），而其他处理组的相似度都较低。此种算法没有考虑到丰度的差异。另一方面，从表 3 中可以看出，食料的差异没有改变属水平上优势菌的组成，所有食料处理下优势菌都是肠球菌 *Enterococcus*，而次优势菌也都是栖热菌 *Thermus*。不过肠球菌中优势菌种的种类因食料的差异而有所差异。*E. mundtii* 和 *E. casseliflavu* 的系统发育型在桑叶及含桑饲料处理组中是优势种，但是在无桑饲料喂养条件下，取而代之成为优势种的是 *E. saccharolyticus*。并且在无桑饲料喂养条件下，SCN2 品系肠道中还出现了一种新的次优势菌葡萄球菌 *Staphylococcus* sp.。

表 5　家蚕 2 个品系在不同食料喂养条件下肠道细菌群落 *Cs* 系数

Table 5　*Cs* coefficients of microflora in midguts of larvae of the two silkworm strains feeding on different diets

	C108-含桑饲料 C108-artificial diet（containing mulberry powder）	SCN2-桑叶 SCN2-mulberry leaves	SCN2-含桑饲料 SCN2-artificial diet（containing mulberry powder）	SCN2-无桑饲料 SCN2-artificial diet（mulberry free）
C108-桑叶 C108-mulberry leaves	33.33	58.82	33.33	33.33
C108-含桑饲料 C108-artificial diet（containing mulberry powder）		28.57	25.00	36.36
SCN2-桑叶 SCN2-mulberry leaves			26.07	19.05
SCN2-含桑饲料 SCN2-artificial diet（containing mulberry powder）				25.00

2.3　DGGE 图谱分析、序列鉴定及与 16S rDNA 文库分析结果的比较

对 C108 和 SCN2 品系家蚕 5 龄幼虫进行肠道细菌 DGGE 图谱分析。结果表明（图 1），同食桑叶时 2 个品系 DGGE 图谱格局相似，这与建库分析结果吻合；同食饲料时格局也相似，而建库分析结果则表明这三种处理间相似性并不高。2 个品系家蚕 5 龄幼虫肠道出现公有条带 A，且该条带不随食料的改变而改变。分别割取 SCN2-桑叶组和 C108 含桑饲料组的 A 条带（分别记作 A1，A2）的测序结果仅能精确到肠球菌属 *Enterococcus*（表 6）。食桑叶组中出现的特有条带 C 经测序被证实是叶绿体 DNA。但

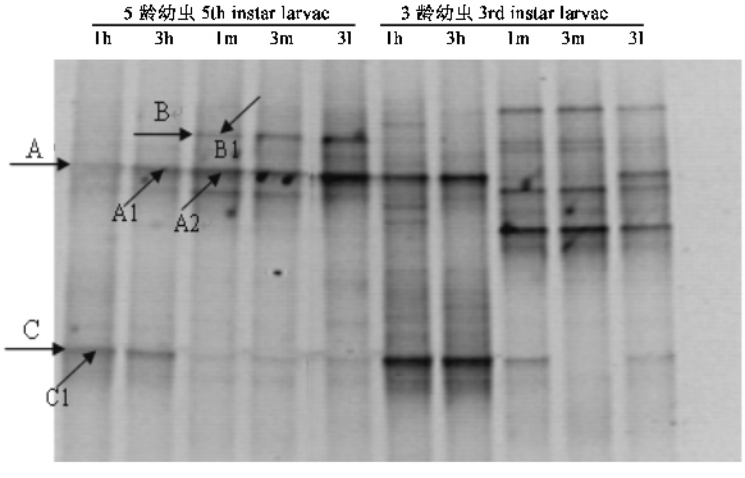

图 1　2 个品系家蚕的 3 龄和 5 龄幼虫在不同食料喂养条件下肠道细菌 DGGE 图谱

Fig.1　DGGE profiles of midgut microflora of the 3rd and 5th instar larvae of the two silkworm strains feeding on different diets

1h：C108-桑叶组 C108-mulberry leaves；3h：SCN2-桑叶组 SCN2-mulberry leaves；1m：C108 含桑饲料组 C108-artificial diet（containing mulberry powder）；3m：SCN2 含桑饲料组 SCN2-artificial diet（containing mulberry powder）；31：SCN2 无桑饲料组 SCN2-artificial diet（mulberry free）. 箭头所指为共有条带，这 3 个条带（A，B，C）被割胶回收测序 Arrows showed the common bands（A,B,C），which had been cut and sequenced（marked with A1，A2，B1，and C1，respectively）.

是图谱中,含桑和无桑饲料喂养条件下出现了一个特有条带B,测序结果与A1一致。建库序列分析并没有发现此种特有分类型。

3龄幼虫中肠细菌DGGE图谱与5龄幼虫有一定的异同。从图1中可以看出,3龄幼虫的桑叶和人工饲料处理组的DGGE图谱格局存在差异,没有相同的优势条带出现。桑叶喂养条件下的DGGE图谱与5龄幼虫的相似;然而人工饲料喂养条件下,3龄幼虫DGGE图谱中出现较多的特有条带,与5龄幼虫的格局差异很大。而品系间DGGE图谱差异不明显。

表6 DGGE割胶回收条带的序列与NCBI数据库比对结果

Table 6 Results of DGGE band sequence of alignment against NCBI database

条带编号 Band no.	基因库中同源性最高的序列 Most closely related hit in GenBank	序列号 Accession no.	一致性 Identity (%)
A1	*Enterococcus* sp.	77415845	100
	E. canintestini	71273473	100
	E. devriesei	73659671	100
	Uncultured bacterium clone	71835609	100
	Bacterium K24	33392094	100
	E. casseliflavus	14030578	100
	E. sp.	71725101	100
	E. dispar	71725096	100
	Uncultured *Enterococcus* sp.	60360919	100
	E. flavescens	17977838	100
	E. pseudoavium	4234616	100
	E. sulfureus	4234615	100
	E. sp.	58013012	100
A2	*E. mundtii*	27753370	100
	E. sp.	83317139	100
B1	同A1 (The same as A1)		
C1	*Cucumis sativus* chloroplast	67511377	100
	Uncultured angiosperm clone	22003780	100
	Fragariax ananassa	41615384	100
	Uncultured bacterium clone	71739436	100
	Trewia nudiflora	62825077	100
	Alnus glutinosa	4097165	100
	A. glutinosa chloroplast	5823577	100
	Ricinis communis	625160	100
	Adriana glabrata	625012	100

3 讨论

利用分子生物学手段对家蚕幼虫中肠细菌多样性进行研究的结果表明,其细菌群落结构相对于白蚁等昆虫来说比较简单,最多有17种系统发育型(C108-含桑饲料组),而最少只有7个(SCN2-含桑饲料组),这和已报道的鳞翅目昆虫多样性程度相类似(Broderick *et al.*, 2004)。DGGE图谱也显示,其多样性程度较低。在这2个家蚕品系的幼虫中肠细菌群落中,昆虫肠道中广泛存在的肠球菌 *Enterococcus* 和栖热菌 *Thermus* 是优势菌群:肠球菌在细菌群落中所占比例最高可达82.72%,栖热菌 *Thermus* 达到15.60%。而曾经有报道的肠杆菌 *Enterobacter* 和微球菌 *Micrococcus*,在本研究中没有发现。Mead等(1988)曾对一种蝗虫 *Melanoplus sanguinipe* 肠道内的肠球菌进行研究,发现该属很多种类能够产生乙酸盐,并推测大量乙酸盐的积累是蝗虫肠道pH低的主要原因。这对于鳞翅目昆虫高pH的肠道可能有一定意义。Broderick等(2004)对舞毒蛾幼虫肠道细菌调查的结果也显示肠球菌是该蛾肠道普遍存在的优势菌,作者认为降低肠道pH值可能保护寄主免受一些毒素的攻击。在家蚕中,已有研究发现肠球菌是其消化道中的高频微生物(Takizawa and Iizuka, 1968)。这类优势菌群可能有降低家蚕肠道pH的作用。家蚕肠道内肠球菌有丰富的生理生化特性(鲁兴萌等,1999)和遗传多样性(王彦文等,2005),可能与家蚕致病性相联系(鲁兴萌等,2003)。也有研究发现肠球菌能抑制家蚕微孢子虫发芽,进而有可能有助于抵抗家蚕微孢子病(鲁兴萌和汪方炜,2002)。

它们的功能和意义目前尚不特别清楚。栖热菌 *Thermus*，在关于家蚕和在其他昆虫肠道细菌的研究中从未有过报道。该属主要生长在较高温度的环境中（Hugenholtz *et al*.，1998），属于嗜热菌类。在家蚕幼虫肠道中却以一定的数量出现，其原因尚有待研究，可能和家蚕特殊的肠道环境有关。此外，本研究只是根据 16S rDNA 序列一致性而确定这些系统发育型属于栖热菌属，还需要进一步用分离和培养的方法对该系统发育型进行生理生化特性的分析，以探讨该菌群在家蚕生理和代谢中可能的作用。

家蚕中肠肠球菌 *Enterococcus* 多样性结构呈现动态变化的趋势。已报道过的家蚕幼虫肠球菌有 *E*. *casseliflavus*、*E*. *faecalis*、*E*. *avium*、*E*. *durans*、*E*. *gallinarum* 和 *E*. *faecium*，还有一些不能确定其分类地位。可能由于环境因素和家蚕品系的差异，不同的研究中报道的优势菌种有所不同，*E*. *casseliflavus*、*E*. *faecalis* 和 *E*. *avium* 均有报道是优势种（鲁兴萌等，1999，2003）。本研究发现的肠球菌优势种的类型分别属于 *E*. *mundtii*，*E*. *casseliflavus*，*E*. *gallinarum* 和 *E*. *saccharolyticus*。有极少数属于 *E*. *dispar* 和 *E*. *canintestini*。除了 *E*. *casseliflavus* 外，其他种类以前均未报道过。从本研究结果也可以看出，肠球菌的组成受喂养条件的影响而有所差异。尤其在无桑饲料喂养条件下家蚕生长严重受阻的时候，中肠内出现一种新的占优势系统发育型，属于 *E*. *saccharolyticus*。曾有报道家蚕在感染微粒子病时，肠球菌种类多样性结构发生变化，*E*. *faecium* 成为优势种（鲁兴萌等，2003）。而在本研究中，无桑食料喂养下家蚕特殊的生理状况下出现的这种肠球菌可能与家蚕食料变化后引起的生理变化有关。

SCN2 品系食无桑饲料时中肠还出现另一类特有的，较占优势的系统发育型，属于葡萄球菌 *Staphylococcus*。葡萄球菌广泛分布于自然界，也有报道它是家蚕肠道的一种优势菌（Takizawa and Iizuka，1968；李蒙英等，2000）。在本研究中，该分类型出现在特殊食料喂养下的肠道环境中，对其寄主有怎样的影响，还不清楚。从表 1 可以看出，无桑饲料对家蚕生长有很大的影响。广食性品系 SCN2 虽然能够忍受无桑饲料，但是这种食性的改变可能是由于某种食性相关基因的突变而导致（Asaoka，2000）。食无桑饲料后，家蚕生长和发育严重受阻，肠道环境也因食料的改变而有所改变。无桑饲料喂养条件下 SCN2 品系的肠道细菌群落组成发生的改变可能并不是由于食料选择了某些特殊的，有益于寄主的功能菌（Broderick *et al*.，2004），而可能是这种不适宜的食料打破了健康肠道内微生物群落结构的平衡性。

家蚕不同发育时期的生理特征有所不同，尤其低龄幼蚕（1～3 龄前期）和高龄幼蚕（3 龄后期～5 龄）之间差异显著，因此出现生理二期现象（陈克平，1998）。张剑飞等（2002）研究发现家蚕肠道细菌格局也存在相对应的‘二期性”。本研究利用 DGGE 对该现象进行初步的探讨，从 DGGE 图谱上看出，桑叶喂养条件下，肠道细菌的‘二期性’并不明显，而饲料喂养则较为明显。这是否因为桑叶表面细菌的影响，尚不清楚，还需要进一步对桑叶附着细菌进行调查。灭菌人工饲料喂养条件下，肠道细菌的‘二期性’提示肠道菌群和家蚕生理可能是密切相关的。

DGGE 分析由于其操作方便和高通量的优点而被广泛用于微生物多样性调查研究中。但是 DGGE 图谱的分析仍然有很大的局限性。首先，DGGE 能够展示的只是优势菌群的结构，检测低丰度种类仍有困难。本研究中，DGGE 比文库序列分析手段展示的细菌群落多样性要低。其次，因为用于 DGGE 分析的 16S rDNA V3 区片段只有 200 bp 左右，其信息量是否能确定细菌的分类地位，仍值得怀疑。DGGE 在有些情况下能够区分同一个种的不同基因型（Reeson *et al*.，2003），但也有时不能鉴定到种水平。在本实验中可能就出现了这样的情况。因此，要准确可信地分析细菌多样性，还需要其他手段的配合使用。

本实验采用分子生物学、不依赖于培养的方法，首次较为系统报道了家蚕幼虫中肠道内细菌多样性。家蚕肠道系统细菌种类组成有一定的特殊性，例如栖热菌的出现。但这一特征是否由其食桑叶这种特殊而单一的食性长期选择的结果，还不清楚。无桑饲料的开发可能成为家蚕产业的一个方向。在广食性品系的筛选培育过程中，注意其肠道微生态结构的改变，可能对其生理有一定的参考意义。另一方面，不仅是家蚕，现在人们对昆虫肠道细菌的了解也都仍然是初步的。食料，寄主生理状态对其肠道细菌的组成都产生影响，这种改变对于寄主自身有怎样的作用，目前仍然还没有能够深入到这个层面。因此进一步了解优势菌及其动态变化，将对于探讨寄主-寄生、共生微生物之间复杂的关系这一热点问题有重要的意义。

致谢　郭秋红、高雷在取材过程中给与了帮助，魏桂

芳在 DGGE 实验中提出了建议，谨表谢意。

参 考 文 献（References）

Asaoka K，2000. Deficiency of gustatory sensitivity to some deterrent compounds in“polyphagous”mutant strains of the silkworm，*Bombyx mori*. *J. Comp. Physiol. A*，186：1 011－1 018.

Brand JM，Bracke JW，Markovetz AJ，Wood DL，Browne LE，1975. Production of verbenol pheromone by a bacterium isolated from bark beetles. *Nature*，254：136－137.

Brauman A，Doré J，Eggleton P，Bignell D，Breznak JA，Kane MD，2001. Molecular phylogenetic profiling of prokaryotic communities in guts of termites with different feeding habits. *FEMS Microbiol. Ecol.*，35（1）：27－36.

Broderick NA，Raffa KF，Goodman RM，Handelsman J，2004. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl. Environ. Microbiol.*，70（1）：293－300.

Brune A，Friedrich M，2000. Microecology of the termite gut：structure and function on a microscale. *Curr. Opin. Microbiol.*，3（3）：263－269.

Campbell BC，1989. On the role of microbial symbiotes in herbivorous insects. In：Bernays E ed. Insect-Plant Interactions. Boca Raton：CRC Press.

Chen KP，1998. Scientifically silkworm breeding based on the physiology of the silkworm. *Sericulture in China*，（1）：31－32.［陈克平，1998. 依据家蚕生理实施科学养蚕. 中国蚕业，（1）：31－32］

Dillon RJ，Charnley K，2002. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Res. Microbiol.*，153（8）：503－509.

Dillon RJ，Vennard CT，Charnley AK，2002. A note：Gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone. *J. Appl. Microbiol.*，92：759－763.

Dillon RJ，Vennard CT，Dillon RJ，Vennard CT，Buckling A，Charnley AK，2005. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecol. Lett.*，8：1 291－1 298.

Douglas AE，Darby AC，Birkle LM，Walters KF，2002. The ecological significance of symbiotic micro-organisms in animals：Perspectives from the microbiota of aphids. In：Hails RM，Beringer J，Godfray HC eds. Genes in the Environment. Oxford：Blackwell Publishing. 306－325.

Edwards U，Rogall T，Blöcker H，Emde M，Böttger EC，1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.*，17：7 843－7 853.

Haynes S，Darby AC，Daniel TJ，Webster G，van Veen FJF，Godfray HCJ，Prosser JI，Douglas AE，2003. Diversity of bacteria associated with natural aphid populations. *Appl. Environ. Microbiol.*，69（12）：7 216－7 223.

Hugenholtz P，PitullIe C，Hershberger KL，Pace NR，1998. Novel division level bacterial diversity in a yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.*，180（2）：366－376.

Lau WWY，Jumars PA，Armbrust EV，2002. Genetic diversity of attached bacteria in the hindgut of the deposit-feeding shrimp *Neotrypaea*（formerly *Callianassa*）*californiensis*（Decapoda：Thalassinidae）. *Microb. Ecol.*，43：455－466.

Li MY，Xu HQ，Yu XH，Wang YR，2000. Survey of the silkworm gut microflora. *Jiangsu Sericulture*，（2）：5－7.［李蒙英，许宏庆，虞晓华，王懿仁，2000. 家蚕肠道菌群的研究. 江苏蚕业，（2）：5－7］

Lu XM，Huang SK，Wang FW，Sun ZG，Zhang F，Chen SL，2003. Distribution of the enterococci isolated from intestine of the pebrine infected silkworm. *Acta Sericologica Sinica*，29（2）：151－156.［鲁兴萌，黄少康，汪方炜，孙振国，张凡，陈盛禄，2003. 微粒子病家蚕消化道内肠球菌的分布. 蚕业科学，29（2）：151－156］

Lu XM，Jin W，Qian YH，Gong CL，1999. Distribution of the enterococci isolated from the intestine of the silkworm，*Bombyx mori*. *Acta Sericologica Sinica*，25（3）：158－162.［鲁兴萌，金伟，钱永华，贡成良，1999. 肠球菌在家蚕消化道中的分布. 蚕业科学，25（3）：158－162］

Lu XM，Wang FW，2002. Inhibition of cultured supernatant of enterococci strains on germination of *Nosema bombycis* spores *in vitro*. *Acta Sericologica Sinica*，28（2）：126－128.［鲁兴萌，汪方炜，2002. 家蚕肠球菌对微孢子虫体外发芽的抑制作用. 蚕业科学，28（2）：126－128］

Ma WS，1982. Gut bacteria of the silkworm with disease of sicking up and its pathogenicity. *Jilin Sericulture*，34（1）：44－53.［马文石，1982. 柞蚕吐白水病蚕中肠内的细菌种类及其致病性的研究. 吉林蚕业，34（1）：44－53］

McKillip JL，Small CL，Brown JL，Brunner JF，Spence KD，1997. Sporogenous midgut bacteria of the leafroller，*Pandemis pyrusana*（Lepidoptera：Tortricidae）. *Environ. Entomol.*，26：1 475－1 481.

Mead LJ，Khachatourians GG，Jones GA，1988. Microbial ecology of the gut in laboratory stocks of the migratory grasshopper，*Melanoplus sanguinipes*（Fab.）（Orthoptera：Acrididae）. *Appl. Environ. Microbiol.*，54（5）：1 174－1 181.

Moyer CL，Tiedje JM，Dobbs FC，Karl DM，1996. A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes：Efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Appl. Environ. Microbiol.*，62（7）：2 501－2 507.

Muyzer G，Brinkhoff T，Nübel U，Santegoeds C，Schäfer H，Wawer C，1998. Denaturant gradient gel electrophoresis in microbial ecology. In：Akkermans A，van Elsas JD，de Bruijn F eds. Molecular Microbial Ecology Manual. Vol. 3.4.4. Boston，MA：Kluwer Academic Publishers. 1－27.

Nakatsu CH，Torsvik V，Øvreås L，2000. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Sci. Soc. Am. J.*，64：1 382－1 388.

Ohkuma M，Kudo T，1996. Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. *Appl. Environ. Microbiol.*，62（2）：461－468.

Reeson AF，Jankovic T，Kasper ML，Rogers S，Austin AD，2003. Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespula germanica*. *Insect Mol. Biol.*，12（1）：85－91

Schmidt TM，Relman DA，1994. Phylogenetic identification of uncultured pathogens using ribosomal RNA sequences. *Methods Enzymol.*，235：

205 – 222.

Takizawa Y，Iizuka T，1968. The aerobic bacterial flora in the gut of larvae of the silkworm，*Bombyx mori* L.（Ⅰ）. The relation between media and the numbers of living cells. *Journal of Sericultural Science of Japan*，37：295 – 305.

Vaughan EE，Schut F，Heilig HG，Zoetendal EG，de Vos WM，Akkermans AD，2000. A molecular view of the intestinal ecosystem. *Curr. Issues. Intest. Microbiol.*，1：1 – 12.

Wang YW，Lu XM，Mu ZM，Kumar VS，2005. RAPD analysis of the enterococci isolated from the silkworm，*Bombyx mori*. *Acta Sericologica Sinica*，31（1）：59 – 63.［王彦文，鲁兴萌，牟志美，Kumar VS，2005. 家蚕来源肠球菌 DNA 多态性的 RAPD 分析. 蚕业科学，31（1）：59 – 63］

Weisburg WG，Barns SM，Pelletier DA，Lane DJ，1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*，173：697 – 703.

Zhang JF，Wang LL，Zhou ZY，2002. Primordial study of bacterial community of larval midgut of the silkworm strain K100 and E23. *Sichuan Sericulture*，（3）：8 – 12.［张剑飞，王林玲，周泽扬，2002. 家蚕 K100 E23 肠道微生物初探. 四川蚕业，（3）：8 – 12］

（责任编辑：黄玲巧）